Aus: dem Städtischen Krankenhaus Neukölln,
II. Innere Abteilung

Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll

SEPARATION MENSCHLICHER LYMPHOCYTEN MITTELS ALBUMIN-DICHTE-GRADIENT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Alfred Biermann aus Melle

1976

Aus: dem Städtischen Krankenhaus Neukölln,
II. Innere Abteilung

Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll

SEPARATION MENSCHLICHER LYMPHOCYTEN MITTELS ALBUMIN-DICHTE-GRADIENT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Alfred Biermann aus Melle

Referent: Prof. Dr. med. Irene Boll

Korreferent: Prof. Dr. med. L. Graf von Keyserlingk

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26 7 1976

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methode	7
II.1	Kontinuierlicher-linearer Gradient	7
II.2	Diskontinuierlicher Gradient	8
II.3	Medienzubereitung	9
II.4	Weitere verwandte Materialien	10
II.5	Versuchsablauf	11
II.6	Auswertung des Versuchs	12
III.	Befunde	14
III.1	Ergebnisse der acht durchgeführten Doppelversuche	14
III.2	Verhalten der Immunoblasten in der Kultur	14
III.3	Verhalten der Stimulierten Lymphocyten	15
III.4	Verhalten der Lymphocyten	15
III.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	16
IV.	Diskussion	19
V.	Zusammenfassung	20
VI.	Tabellen zu den durchgeführten Versuchen	21
VII.	Abbildungen	28
VII.1	Graphische Abbildungen	29
VII.2	Abbildungen von Immunoblasten, stimulierten Lymphocyten und Lymphocyten aus PHA-Kulturen der Fraktionen I - IV	31
VII.3	Abbildungen von Immunoblasten, stimulierten Lymphocyten und Lymphocyten aus Endotoxin-Kulturen der Fraktionen I-IV	35
VIII.	Literaturverzeichnis	39

. Einleitung

In der Diagnostik von haematologischen Erkrankungen hat sich die Blut- oder Lymphocytenkultur einen festen Platz geschaffen. Das Verhalten der Lymphocyten "in vitro" wird als Mass für die Reaktionsfähigkeit des Immunsystems "in vivo" angesehen. Aus dem Ergebnis versucht man, therapeutische und prognostische Aussagen abzuleiten.

Unsere heutige Vorstellung über das Immunsystem ist vorwiegend aus den Untersuchungen von Mäusen und Vögeln entwickelt worden. Ihr liegt die These zugrunde, dass es mindestens zwei verschiedene Lymphocytenarten, B- und T-Lymphocyten gibt (COOPER u.a. 1965, RAFF 1973, PEREIRA 1974, METCALF u.a. 1975).

Die klinische Bedeutung dieser Einteilung geht schon aus Erkrankungen des lymphatischen Gewebes hervor (GOOD u.a. 1971). Bei einem speziellen Mäusestamm treten Tumore des lymphatischen Gewebes, Lymphome, auf. Werden die Tiere vorher thymektomiert, treten diese Tumore nicht auf (STUTMAN u.a. 1969, COOPER und LAWTON 1974). Dies gilt als eine Erkrankung des T-Zell-produzierenden Gewebes. Andererseits ist bei Hühnern ein virus-induziertes Lymphom bekannt, das sich in allen Organen entwickeln kann, sich aber nur in der Bursa fabricii, einem lympoiden Organ, nahe der Cloake bei Vögeln maligne differenziert. Entfernt man bei Hühnern die Bursa, so verhindert man die Entwicklung dieses Lymphoms (COOPER u. LAWTON 1974). Diese Erkrankung gilt als B-Zell-Malignom.

Beim Menschen wird die Brutonsche Agamma-Globulinaemie als Folge eines B-Lymphocytendefektes gedeutet, das Di-George-Syndrom als Folge einer Thymusaplasie mit daraus resultierendem T-Lymphocytenmangel und Fehlen der zellständigen Abwehrreaktion (GOOD u. a. 1966, BEGEMANN und HARWERTH 1974).

B-Lymphocyten sind also verantwortlich für die humorale Abwehr, T-Lymphocyten für zelluläre Abwehr im menschlichen Organismus.

Bereits 1965 wurde von JIJI u.a. bei der Behandlung einer Patientin mit akuter Leukaemie der Thymus entfernt; jedoch brachte der Eingriff keinen Erfolg. HUBER und PASTNER (1969) erwähnen zwei erfolgreiche Thymustransplantationen bei dem Di-George-Syndrom.

Gelänge es nun, menschliche T- und B-Lymphocyten getrennt zu erhalten, so liessen sich neue Aussagen über das Verhalten unseres Immunsystems erwarten.

Morphologisch unterscheiden sich T- und B-Lymphocyten nicht; nur bei rastermikroskopischer Betrachtung nach Trocknung der Präparate mit der critical-point-Methode erscheint die Oberfläche der B-Lymphocyten mikrovillireich, die der T-Lymphocyten relativ glatt (POLLIAK u. a. 1973). Sie lassen sich aber doch mit verschiedenen anderen Methoden auseinanderhalten bzw. trennen, z.B. mittels Oberflächenantigenen. Das "theta" genannte Antigen kommt nur auf T-Lymphocyten und Thymocyten vor. Mit dieser Methode sind auch Untergruppen der T-Lymphocyten gefunden worden (OWEN 1972, JERNE 1973, RAFF 1973). Mittlerweile sind mehrere solcher sogenannter Differenzierungsantigene bekannt (RAFF 1973). Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit, die im folgenden Verwendung fand, ist durch das in-vitro-Verhalten der Lymphocyten auf Mitogene oder antigenwirkende Substanzen gegeben. Bei den Mitogenen macht man sich die Eigenschaften von Fremdsubstanzen zunutze, dass sie - in Lymphocyten- oder Blutkulturen gegeben - reproduzierbar folgende morphologische und funktionelle Veränderungen der Lymphocyten bewirken: z.B. Grössenzunahme der Zellen (LENNERT 1966), der Kerne (MUNIZ u.a. 1970), RNS-DNS-Synthese (RIVERA u. MÜLLER 1966, YAMAMOTO 1966, PAULI u. STRAUSS 1973), Auftreten von Mitosen (LENNERT 1966), Substanzaufnahme, z.B. K^+, Ca^{++}, Aminosäuren (AVERDUNK 1972).

Bei solchen Substanzen hat man zu unterscheiden zwischen unspezifischen Mitogenen, z.B. Phytohaemagglutinin (PHA), Substanzen, die unabhängig von einer Sensibilisierung, also einem vorausgegangenen Antigenkontakt des Spenders, dessen Lymphocyten

timulieren (ELVES u. WILKINSON 1962, PAPPAS u. SCHEURLEN 1967, APPAS 1975) und spezifischen Mitogenen, z.B. Tuberkulin und ndotoxin, die nur Lymphocyten stimulieren, die gegen ein entprechendes Antigen sensibilisiert sind. Mittlerweile sind iele derartige Substanzen bekannt (PAPPAS 1975).

ie Arbeit mit derartigen Substanzen begann mit einer Beobachung von NOWELL (1960), der in Blutkulturen, die zuvor mit PHA ehandelt worden waren, um Erythrocyten abzutrennen, vermehrt itosen in den Leukocyten feststellte.

HA ist wohl das bekannteste Mitogen und wurde bereits 1916 von ORSET und HENLEY (nach PAPPAS 1975) in seiner erythrocytenggglutinierenden Eigenschaft erkannt. Wiederentdeckt haben es 949 LI und OSGOOD, und nach NOWELL (1960) fand es Eingang in die lut- und Lymphocytenkultur.

HA ist ein Wasser- oder Salzextrakt aus der Bohne Phaseolus ulgaris oder Phaseolus communis und besitzt haem- und leukoggglutinierende Wirkung; hinzukommen die mitogene Wirkung - itoseanregung - verbunden mit einer Stimulation zur Grössen - unahme, Aminosäureneinbau, RNS- und DNS-Neusynthese (PAPPAS 975). PHA hat ein Molekulargewicht von etwa 128.000 und wird owohl von Lymphocyten als auch von Granulocyten aufgenommen RASAVI 1966, PAPPAS 1975).

ie extrahierte Substanz lässt sich technisch aufgliedern in inen Polysaccharid- und einen Globulinanteil (RIGAS u. OSGOOD 955), welcher haemagglutinierende Eigenschaften hat. ROBBINS nach PAPPAS 1975) spaltete PHA in 14 Komponente mittels Elekrophorese auf. PAPPAS (1975) berichtet von 10-12 Fraktionen it unterschiedlicher Wirkung, die aus höchst gereinigtem PHAxtrakt erhalten wurden. RIVERA (1966) berichtet von 4 verchiedenen mitogenen Fraktionen und ordnet einer Fraktion die auptsächliche Wirkung zu. Adsorption des PHA an NaCl-Lösung rennt die erythrocytenagglutinierende Wirkung sicher von der itogenen Wirkung ab. Schliesslich gelang 1969 die Aufgliederung in leukoagglutinierende und mitogenen Fraktionen im Verhältis 25:1 (PAPPAS 1975). Hiermit wird verständlich, dass u.U.gleihe Versuchsansätze zu differierenden Ergebnissen führen (ELVES u.

WILKINSON 1962, PAPPAS 1975). Das Verhalten der kultivierten Lymphocyten ist ausser von dem Mitogen selbst von verschiedenen anderen Faktoren abhängig: Konzentration (SAULI u. ASTALDI 1963, CIRKOVIK 1970, COULSEN u. COHN 1973), Einwirkzeit (SAULI u. ASTALDI 1963) und Oberflächenkontakt zwischen Lymphocyten (HÜLSER u. PETERS 1972); nach TÄRNAVIK (1971) scheint das Vorhandensein von Erythrocyten ein wichtiger Bestandteil der mitogenen Wirkung zumindest eines Teils des PHA zu sein.

Endotoxin ist eine in gram-negativen Bakterien enthaltene thermolabile Substanz, die durch Aufschliessen der Bakterien gewonnen werden kann. Im Gegensatz dazu wird Exotoxin - auch Ektotoxin genannt - von den gram-positiven Bakterien abgesondert, z.B. Staphylokokken und Streptokokken. Endotoxin hat pyrogene (WENDT 1962, RAFFTER 1969) und antigene Wirkung. Die antigene Wirkung kann man sich für Kulturzwecke zunutze machen. Man erwartet dabei eine Stimulierung von Lymphocyten, die schon einmal mit diesem Antigen in Berührung gekommen sind; so erklärt sich auch die Einordnung des Endotoxin in die Gruppe der spezifischen Stimulantien.

Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Lipid-A genannte Substanz (GALANOS u.a. 1971, JANOSSY u.a. 1973)die eigentliche stimulierende bzw. mitogene Fraktion des Endotoxin ist (PEAVY u.a. 1970, PEAVY u.a. 1973). Daher kommt die häufig verwandte Abkürzung LPS, Lipopolysaccharid. Neben den produzierenden Bakterien scheinen weitere Faktoren die Wirksamkeit des Endotoxin zu beeinflussen: die Züchtungsbedingungen der Bakterienkultur, das pH der Extraktionssubstanz, die Konzentration im Kulturmedium, die Löslichkeit der Substanz, die durch Zugabe von Ionen aufgehoben werden kann (PEAVY u.a. 1973, GALANOS u.a. 1971).

Besonderes Interesse gewannen die Endotoxine, als sich in Versuchen mit Mäusezellen herausstellte, dass die beiden vermuteten Lymphocytenpopulationen, T- und B-Lymphocyten, getrennt stimuliert werden konnten. Bevorzugt bzw. selektiv stimuliert wurden T-Lymphocyten durch PHA, B-Lymphocyten durch Endotoxin

ANOSSY u. GREAVES 1971, 1972, ANDERSON u.a. 1972, CHILLER u.a. 973). Diese Ergebnisse sind nicht unwidersprochen geblieben ATSON u.a. 1973).

ich beim Menschen wurden bei Kulturversuchen mit Lymphocyten ter PHA-Zusatz zwei verschiedene Lymphocytengruppen festge-elit. (WINKELSTEIN u. CRADDOCK 1967, HAVEMANN u. SCHMIDT 1968). REAVES und ROITT vermuteten 1968, dass bursa-abhängige Lympho-yten nicht PHA-sensibel sind.*) Dieser Auffassung ist allerdings dersprochen worden (PHILLIPPS u. ROITT 1973). PEAVY (1970) onnte keine Stimulation menschlicher Lymphocyten durch Endo-oxin feststellen.

ei gesunden Personen werden in Lymphocytenkulturen unter PHA-timulation ca. 80 % Immunoblasten beobachtet (STOBBE u. HEINE 969, PAPPAS 1975) und unter spezifischer Stimulation ca. 30 % 1-89) (STOBBE u. HEINE 1969). Unstimulierte Kontrollgruppen eigen bis zu 4 % Immunoblasten (PAPPAS 1975). Werden menschliche ymphocyten einem spezifischen oder unspezifischen Mitogen aus-esetzt, so geschieht gesetzmässig und in folgender Reihenfolge olgendes (HEINE 1973):

. Die im Durchmesser 5-8 µm grossen Lymphocyten nehmen an Grösse bis zu 10-13 µm zu.
. Das Cytoplasma wird basophil.
. Der Zellkern wird aufgelockert, retikulär und grösser.
. Mit zunehmender Zell- und Kernvergrösserung treten meist ein oder mehrere Nucleoli deutlich hervor. Diese sind bei unstimulierten Lymphocyten in der Pappenheimfärbung nicht sichtbar.
. Perinucleäre Aufhellungen können auftreten (Cytozentrum).
. Das Cytoplasma bildet später Ausstülpungen als Ausdruck der amöboiden Beweglichkeit aus.
. Vakuolen können auftreten. Die im Plasma auftretenden Vakuolen entsprechen den im Phasenkontrast sichtbaren Glanzkörnern oder sekundären Lysosomen.

iese Zellen werden als Immunoblasten bezeichnet (DAMESHEK 1963).

---

*) **Das Äquivalent der Bursa bei den Säugetieren und Menschen konnte immer noch nicht eindeutig bestimmt werden.**

Andere Namen wie Lymphoblast, Germinoblast und basophile Stammzelle sind gebräuchlich (BERMAN 1963, LENNERT 1966, DAMESHEK 1967).

Diesen morphologischen Veränderungen parallel laufen biochemische Reaktionen, wie schon oben ausgeführt.

II. Material und Methode

Ziel dieser Arbeit war es, aus venösem Blut von gesunden Probanden Lymphocyten verschiedener Dichte zu trennen und ihr unterschiedliches Verhalten gegen PHA und Endotoxin morphologisch auszuwerten. Dabei wurde davon ausgegangen, dass PHA menschliche T- und Endotoxin B-Lymphocyten stimuliert.

Die von uns benutzte Methode zur Blutzelltrennung beruht darauf, dass eine durch ihre spezifische Dichte (Grösse und Gewicht) definierte Zelle sich in einem Medium steigender Konzentration (Dichte, g/ml) an dem Dichtepunkt auf hält, der ihrer spezifischen Dichte entspricht.*) Hierzu boten sich zwei Verfahren an:

II.1 Kontinuierlicher-linearer Dichtegradient
(LEIF u. VINOGRAD 1964, LEGGE u. SHORTMAN 1968, LEIF 1968, SHORTMAN 1968, 1969, 1972, SHORTMAN u.a. 1972).

II.2 Diskontinuierlicher Gradient
(DICKE 1970, RIETHMÜLLER 1970, VOGT u.a. 1973, DICKE u.a. 1974).

ad II.1
Beim kontinuierlichen Gradienten wird über eine peristaltische Pumpe leichtes Medium (19%) in eine mit schwerem Medium (29%) und Blutzellen gefüllte Mischkammer gedrückt; unter ständigem Rühren wird mit gleicher peristaltischer Pumpe doppelt soviel Medium abgesogen wie eingedrückt und in eine spezielle Ausheberkammer gebracht. Dabei kann ein linearer Gradient erwartet werden. Ist der Gradient entwickelt, wird das Röhrchen zentrifugiert, anschliessend werden die Zellen über einen Ausheber vom Boden aus herausgedrückt. Alle Arbeiten müssen bei +4°C durchgeführt werden. Diese Methode ist arbeitsintensiv, technisch sehr aufwendig und birgt viele - speziell bei der uns zur Verfügung stehenden Ausrüstung - schwer zu kontrollierende Parameter, z.B. konstanter Pumpenlauf, Schlauchmaterial, Konstanz des Rührerlaufs, Gleichlauf und Abbremsver-

*) **Schwere Zellen finden sich demnach in Medium mit hoher Konzentration, z.B. 29 % Albumin, leichte Zellen in Medium geringerer Konzentration, z.B. 23 % Albumin.**

halten der Zentrifuge u.a.m. (LEIF 1968, SHORTMAN 1968, 1972). Hinzu kommt, dass die Lymphocyten eines Spenders sich z.B. in Abhängigkeit von einer Infektion an anderer Stelle einstellen können als erwartet (SHORTMAN 1972). Um dennoch reproduzierbar einen gleichen Lymphocytenbereich zu erhalten, wird es nötig, einen relativ grossen Dichtebereich auszuwählen und man verliert so den Vorteil des linearen Gradienten, d.h. die wirklich optimale Zuordnung der Zellen zu dem Punkt ihrer Dichte bzw. zu Fraktionen. Wählt man aber einen grösseren Dichtebereich für die gewünschten Fraktionen aus, so kommt man in Konzentrationsbereiche oder Stufen, wie sie beim diskontinuierlichen Gradienten gegeben sind. Eigene Versuche haben die hier aufgeführten Unsicherheiten bestätigt. Aus diesem Grunde sind die hier berichteten Ergebnisse mit der diskontinuierlichen Gradienten-Methode erzielt worden.

ad II.2

Bei dem diskontinuierlichen Gradienten werden in einem Zentrifugenröhrchen Medien verschiedener Konzentration so übereinandergeschichtet, dass sich Phasengrenzen an den Konzentrationsstufen bilden. Wir benutzten die Konzentrationsstufen 19-21-23-25-27-29, Bodensatz 33 %. Schweres Medium liegt am Boden, leichtes - hierin eingemischt die Blutzellen - oben. Nach Zentrifugation von 30 Minuten bei 2000 g mittlerer Röhrchenlänge stellen sich die Zellen in charakteristischen Dichtestufen (Fraktionen) an/oberhalb der Phasengrenze ein (Interphase). Fraktion I entspricht Albumin von 19/21 %, Fraktion II 21/23 %, Fraktion III 23/25 %, Fraktion IV 25/27 % usw. Durch Punktion des Zentrifugenröhrchens an der Seite in Höhe der Interphase mittels Kanüle und Spritze werden die Zellen interphasig abgenommen, dann gewaschen und kultiviert. Bei dieser Methode muss bei +4°C gearbeitet werden, denn bei höheren Temperaturen kann man Strömungen im Gradienten erwarten, die die Ergebnisse verfälschen würden. Auf dem Boden des Zentrifugenröhrchens wird ein Kissen aus ca. 0,4 ml 33 %igem Albumin zum Auffangen durchfallender, zerstörter Zellen gelegt.

Wichtig ist bei dieser Methode neben konstanter Temperatur am Arbeitsplatz und in der Zentrifuge, dass die Zellen im Albumin gleichmässig suspendiert sind, bevor sie aufgelagert werden, da sich sonst Zellklumpen bilden können, die schneller und an andere Stelle sedimentieren. Ebenfalls bedeutungsvoll ist die Zentrifugalkraft, denn davon ist die Reproduzierbarkeit und Ausbeute des Gradienten abhängig (SHORTMAN 1968, 1969). Optimal sind ca. 2000 g bei dem diskontinuierlichen Gradienten. Schliesslich muss die Zellzahl des Gradienten in den Versuchen annähernd konstant gehalten werden; eine Überladung ist zu vermeiden (SHORTMAN 1968, 1972), denn es entstehen sonst Zellaggregationen. Bei dem beschriebenen Gradienten mit 2 ml Fraktionen ist eine Zellzahl von bis zu 5×10^8 Zellen pro Gradient möglich.

II.3 Medienzubereitung

Sehr bedeutungsvoll ist die Zubereitung des Mediums. Verschiedene Substanzen sind zur Zellaufteilung benutzt worden. Neben Gummi-Arabicum, kristallinen Substanzen und vielen anderen scheint Albumin in diesen Konzentrationen noch am verträglichsten für die Zellen zu sein.(SHORTMAN 1969, RIETHMÜLLER u.a. 1970). Aus diesem Grunde haben wir Bovines-Serum-Albumin, BSA, Fraktion V, Cohn'sche Fraktion, benutzt. Bei der Zubereitung muss die Osmolarität, die Konzentration und das pH beachtet werden (LEIF u. VINOGRAD 1964, LEGGE u. SHORTMAN 1968, SHORTMAN 1968, 1969, 1972, SHORTMAN u. SELIGMAN 1969).

Das pH ist wichtig, weil sich mit pH-Änderungen das Zellverteilungsmuster ändert (DICKE u.a. 1974). Das Albumin wurde menschlichem Blut isoton gemacht, das entspricht 300 mosm.

Wir benutzten Albumin der Firma Serva, Cohn'sche Fraktion V, in Pulverform. Da der Salzgehalt dieser käuflichen Fraktionen nicht konstant ist, muss die Substanz gelöst, entsalzt, gefriergetrocknet und dann auf eine Konzentration von 35 % und 300 mosm eingestellt werden. Die Konzentration wurde auf einem

Refraktometer und anhand einer Eichkurve, die mit Werten von DICKE (1970) übereinstimmte, gemessen. Danach wurden die gewünschten Konzentrationsstufen hergestellt, Millipore-gefiltert (0,22 u Durchmesser), in sterile Fiolax-Glasampullen abgefüllt und bei minus 30°C gelagert. Das von uns mittels pH-Meter bestimmte pH der Albuminfraktionen war 5,4; die Osmolarität aller Fraktionen, gemessen mit einem Kryometer, ergab 300 ± 2 mosm. Jedoch dürften auch leicht erhöhte Werte die Lebensfähigkeit der Zellen nicht beeinträchtigen (WHEATLEY 1974), wohl aber die Zellverteilung (SHORTMAN 1969).

II.4 Weiter verwandte Materialien

Macrodex der Firma Knoll, MG 200 000, 6 %;
Heparin der Firma Roche, Konzentration 10 IE pro ml Blut;
Kulturlösung: RPMI 1640 der Firma Serva;
Ampicillin der Firma Grünenthal;
Streptothenat der Firma Grünenthal;
PHA der Firma Difco, Detroit, Michigan, USA: Bacto-Phytohaemagglutinin, Kontroll-Nr. 598556, Trockensubstanz 1 g (ausgewogen) lösbar in 5 ml Aqua dest.;
Endotoxin der Firma Difco, o.a., Nr. 3124-25, 100 mg Trockensubstanz;
Zentrifuge Beckman, Spinco L-2, kühlbar;
Rotor, Beckman-SW 25-2, der von der AG Biochemie des Klinikum Steglitz, FUB, zur Verfügung gestellt wurde. Spezielle Einsätze für die Zentrifugenröhrchen wurden angefertigt;
Polyallomer-Zentrifugenröhrchen der Firma Beckman, Maße: Durchmesser 1,6 cm, Länge 10,6 cm;
Fotografien wurden mit einem Zeiss-Fotomikroskop und Agfachrom-N-Kunstlicht-Filmen aufgenommen. Anschliessend wurden Papierbildabzüge angefertigt. Die Vergrösserung beträgt einheitlich ca. 1350:1.

II.5 Versuchsablauf *)

Morgens gegen 8 Uhr wird den Spendern mit einer Kanüle der Stärke Nr. 1 aus der Vena cubiti Blut entnommen; pro Versuchsansatz 50-75 ml, das entspricht 100-150 ml pro Spender; die Heparinkonzentration beträgt 10 IE pro ml Blut. Blutbilder werden angefertigt. Danach wird das Blut mit 37°C warmem Macrodex im Verhältnis 1:5 Teile Blut in einem Zentrifugenröhrchen gemischt und im Brutschrank bei einer Schräglage von 45° für 90 Minuten belassen. Der leukocytenreiche Heparin-Plasma-Überstand von durchschnittlich 45-50 vol% des Ausgangsvolumens wird abgesogen und bei 90 g 10 Minuten zentrifugiert. Der jetzt zellfreie Überstand wird verworfen, die im Bodensatz vorhandenen Zellen werden nicht gewaschen, sondern mit 2 ml 17 %igem Albumin gut gemischt und danach auf die Arbeitstemperatur von +4°C langsam abgekühlt. Somit besteht die dem Gradienten aufzulagernde Fraktion aus Leukocyten, wenig Erythrocyten, Heparinspuren, Blutplasma und 17 % Albumin in einem Gesamtvolumen von 2 ml.

Die Albuminfraktion wird mittels einer Mikropipette im Volumen von 2 ml dem bis zur Stufe 19 % vorbereiteten Gradienten aufgelagert. Danach wird zentrifugiert und die Fraktionen in beschriebener Weise abgenommen.

Um die reinen Zellen zu erhalten, müssen sie aus dem Albumin herauszentrifugiert werden, was mit einer dreifachen Zellwäsche in ca. 5facher Lösung RPMI 1640 verbunden wird. Dazu müssen die Zellen gut aufgeschüttelt werden. Die Zellen werden das erste Mal bei 90 g, danach mit 50 g jeweils 7 Minuten zentrifugiert und anschliessend in RPMI 1640 suspendiert.

Zur Kultivierung der Zellen erfolgt der Transport eisgekühlt ins Städt. Krankenhaus Neukölln, Haematologisches Labor.

Kultiviert wurde jede einzelne der Fraktionen I bis IV, da in Vorversuchen festgestellt worden war, dass in diesen 4 Frak-

*) Die Versuche wurden in dem Labor von Herrn Prof. Dr. H.R. Maurer, Institut für Pharmazie der FUB, durchgeführt.

tionen Lymphocyten gefunden werden. Nach der Bestimmung der Zellzahl pro Fraktion wird die Kultur so bemessen, dass eine Zellzahl von 2000 /µl und ein maximales Gesamtvolumen von 5 ml in einem verschliessbaren 25 ml-Erlenmeier-Kölbchen erreicht wird.

Von jedem Spender werden zwei Kulturen pro Fraktion angelegt, eine mit PHA, die andere mit Endotoxinzusatz. Den Zellen im Kulturmedium RPMI 1640 wird PHA in einer Konzentration von 0,004 g pro 5 ml Kultur oder Endotoxin in einer Konzentration von 0,02 mg pro ml Kultur sowie 400 IE Ampicillin und und 250 IE Streptothenat zugesetzt. Die verschlossenen Kulturen werden unbegast bei 37° C aufbewahrt und nach 24, 48, 72, 144 Stunden zur Probeentnahme geöffnet. Die Ausstriche erfolgen durch eine Cytozentrifuge bei 20 g, 5 Minuten, mit ca. 0,5 ml gut durchmischter Kultursubstanz. Ein Ausgangspräparat zur Zeit 0 Stunden wird hergestellt. Es schliesst sich die Pappenheimfärbung und die Auswertung an.

II.6 Auswertung des Versuchs

Ein Blutbild und ein Differentialblutbild werden hergestellt. Die Auswertung der Kulturen geschieht durch Zellzahlbestimmung zum Zeitpunkt der Probeentnahme mittels Kammerzählung in einer Neubauer-Kammer, das lichtmikroskopische Differenzieren aller auf einem Objektträger vorhandenen Zellen bei 1000facher Vergrösserung. Ausdifferenziert werden etwa 500 Zellen pro Stichprobe. Die Zellzahl einer Zellart wird in Prozent angegeben. Die Stimulationsrate pro Fraktion wird jeweils auf die Gesamtzellzahl pro Stichprobe bezogen.

In den Kulturen und im Original konnten 7 Zellarten unterschieden werden. Da es bisher keine einheitliche Nomenklatur für Lymphocyten unter dem Einfluss von Mitogenen gibt, unterschieden wir 4 Arten von Lymphocyten bzw. stimulierten Lymphocyten und Immunoblasten, die hier beschrieben werden sollen (Abb. 5 bis 17, S.33 ff):

1. Lymphocyten (Abb. 11): 5 bis 8 µm grosse rund-ovale Zellen mit rundem oder eingebuchtetem Kern, der bis zu 7 µm gross ist; das Chromatin ist grobschollig marmoriert; Nucleolen sind nicht erkennbar. Das hellbasophile Cytoplasma umlagert oft halbkreisförmig den Kern und ist teils feintropfig aufgehellt, teils mit Azurgranula durchsetzt.

2. Stimulierte Lymphocyten (Abb. 6): Zellen bis zu doppelter Lymphocytengrösse und ca. 7 - 10 µm grossem Kern; dieser hat aufgelockerte Kernstruktur, es darf kein Nucleolus sichtbar sein; das Cytoplasma ist wechselnd hell oder dunkel basophil.

3. Ist ein Nucleolus erkennbar, wird die Zelle zu den kleinen Immunoblasten gezählt (Abb. 6 und 13). Dieser ist noch etwas grösser als ein stimulierter Lymphocyt (bezogen auf eine Lymphocytenkultur), zeigt ausserdem einen deutlichen Nucleolus, eine reticuläre Kernstruktur und teilweise Vakuolen im Cytoplasma, welches breiter geworden ist und hell oder dunkel basophil erscheint. Die Kerngrösse liegt bei 9 bis 12 µm.

4. Grosse Immunoblasten (Abb. 5, 7, 15): Zellen, die vierfache Lymphocytengrösse überschreiten können, einen oder mehrere deutliche Nucleolen im reticulären Kern zeigen; das Cytoplasma ist wechselnd hell oder dunkel basophil, oft mit vakuoligen Einschlüssen durchsetzt. Ausser der Grösse zeigen Immunoblasten dieser Grössenordnung lichtmikroskopisch keinen Unterschied zu kleinen Immunoblasten. Die Kerngrösse der grossen Immunoblasten kann bis zu 15 µm im Durchmesser betragen.

Ausserdem traten noch folgende Zellen auf:

5. Granulocyten,
6. Monocyten und
7. Makrophagen.

III. Befunde

III.1 Ergebnis der acht durchgeführten Doppelversuche:

Auf den Gradienten wurden durchschnittlich 4×10^8 Leukocyten aufpipettiert. Die Kontamination von Erythrocyten wurde nicht gemessen. Die ermittelte durchschnittliche Zellzahl betrug in

Fraktion I	entsprechend 19/21 % Albumin	4125
Fraktion II	entsprechend 21/23 % Albumin	14150
Fraktion III	entsprechend 23/25 % Albumin	24200
Fraktion IV	entsprechend 25/27 % Albumin	14025 *)

Der Durchschnitt der Lymphocyten im Differentialblutbild (Tab. 1) betrug bei den Spendern 38,4 %.

In den Fraktionen V und VI, entsprechend 27/29 und 29/31 % Albumin, wurden nahezu alle Granulocyten, Erythrocyten und Thrombocyten gefunden. Da diese Zellen für diesen Versuch nicht interessieren, wird weiterhin nur über die Ergebnisse der Stimulation der Fraktionen I bis IV berichtet werden.

III.2 Verhalten aller Immunoblasten in der Kultur

Betrachtet man die grossen (Abb. 5, 7, 15) und die kleinen (Abb. 6, 15, 17) Immunoblasten zusammen (Tab. 2 u. 3, sowie 4 bis 11) so enthält man folgendes Stimulationsmuster:

1. Mit PHA wird die höchste Stimulationsrate in Fraktion I zum Zeitpunkt 48 Stunden mit 51 % erreicht (Tab. 4, Abb. 5 u. 6). Danach ist die Kultur gestorben. Die Zellen dieser Kultur sind kurzlebiger als die anderer Kulturen.

2. Die höchste Stimulationsrate mit Endotoxin wird in Fraktion IV nach 72 Stunden mit 76 % gefunden (Tab. 11, Abb. 16 u. 17).

---

*) Bei einem Zählvolumen von 3 ml pro Fraktion ergibt sich eine Gesamtzellzahl für die Fraktion I bis IV von ca. $1,7 \times 10^8$, was einer durchschnittlichen Wiedergewinnung von 42,5 % der eingegebenen Zellen entspricht. Die Lymphocytenreinheit der Fraktionen I bis IV von ca. 83,6 % (69,7 bis 90,1) lässt eine Ausbeute an Lymphocyten von $1,4 \times 10^8$ Lymphocyten oder 82,3 % der eingegebenen Zellen errechnen.

In allen Fraktionen lässt sich eine zeitabhängige kontinuierliche Zunahme der Stimulationsrate feststellen. Eine Ausnahme macht Fraktion II unter PHA (Tab. 6 u. 4-11). Hier fällt die Stimulationsrate bei 72 Stunden etwas ab, um einen erneuten Gipfel nach 144 Stunden zu erreichen. Mit Ausnahme von Fraktion I unter PHA-Zusatz wurden maximale Stimulationsraten in diesen Versuchen in Endotoxinkulturen festgestellt (Abb. 1, 2, 3, 4).

Weiter lässt sich feststellen, dass in allen acht Kulturen mehr kleine Immunoblasten als grosse gefunden werden, und dass PHA offensichtlich die höchsten Stimulationsraten für grosse Immunoblasten erzielt. Das Maximum der grossen Immunoblasten liegt in Fraktion IV nach 72 Stunden bei 10 % (Tab. 10, Abb. 10).

III.3 Verhalten der Stimulierten Lymphocyten (Abb. 6, 15)

Die stimulierten Lymphocyten zeigen unterschiedliches Verhalten auf PHA und Endotoxin. Die höchste Stimulationsrate unter PHA findet sich in Fraktion III nach 72 Stunden mit 57,4 % (Tab. 9), d.h. das Maximum der Stimulation ist einheit nach 72 Stunden erreicht. Endotoxin stimuliert in den Fraktionen I, II u. IV mehr als PHA (Tab. 5, 7, 11). Der höchste Wert unter Endotoxin findet sich in Fraktion I nach 72 Stunden: hier liegen 84,7 % stimulierte Lymphocyten vor. Dieser Wert liegt deutlich über den Werten unter PHA-Stimulation.

III.4 Verhalten der Lymphocyten

Bei den Lymphocyten kann man unter beiden Mitogenen mit zunehmender Kulturdauer eine kontinuier iche Verminderung der Lymphocyten beobachten. Nur Fraktion II zeigt nach 144 Stunden eine Lymphocytenvermehrung sowohl unter PHA als auch unter Endotoxin (Tab. 6 u. 7). Diese Fraktion II ist unter beiden Mitogenen deutlich langlebiger als alle übrigen Kulturen.

III. 5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In PHA stimulierten Lymphocytenkulturen finden sich Immunoblasten bevorzugt in Fraktion I nach 48 Stunden und nach 72 Stunden in Fraktion IV; die höchsten Werte der stimulierten Lymphocyten sind in Fraktion III nach 72 Stunden anzutreffen.

In mit Endotoxin stimulierten Lymphocytenkulturen sind stimulierte Lymphocyten am zahlreichsten in Fraktion I nach 72 Stunden vorhanden; Immunoblasten sind am stärksten in Fraktion IV nach 72 Stunden gebildet worden.

In allen Versuchen sind überwiegend kleine Immunoblasten gewachsen; bezogen auf jede Fraktion werden in der Regel große Immunoblasten verstärkt unter PHA-Einfluss gebildet. Das Maximum liegt in Fraktion IV nach 72 Stunden.

IV Diskussion

In unseren Versuchen sind erstmals Zellen aus venösem Blut gesunder Menschen über einen diskontinuierlichen Albumingradienten in 4 Fraktionen aufgegliedert und in parallelen Versuchsansätzen mit PHA und Endotoxin stimuliert worden.

Vorversuche, die klären sollten, ob dem kontinuierlichen Gradienten mit seinem hohen Auflösungsvermögen der Vorzug vor dem diskontinuierlichen Gradienten mit seinen Dichtesprüngen gegeben werden sollte, führten bei uns nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen mit dem kontinuierlichen Gradienten. Die Ursache dafür ist in den uns zur Verfügung stehenden Geräten zu suchen, die es - wie bereits erwähnt - nicht ermöglichten, die einzelnen Parameter genügend genau zu kontrollieren.

Aus diesem Grunde führten wir unsere Versuche mit dem diskontinuierlichen Gradienten durch. Mit einer durchschnittlichen Lymphocytenreinheit von 83,6 % und einer Lymphocytenausbeute von 82,3 % pro Versuch erzielten wir reproduzierbare Ergebnisse.

Die bei der anschliessenden Kultivierung erhaltenen Werte der Lymphocyten, stimulierten Lymphocyten und Immunoblasten lassen sich so deuten, dass aus den Lymphocyten zuerst stimulierte Lymphocyten und dann Immunoblasten werden, wie schon aus unzähligen Versuchen mit Vollblut bzw. Lymphocytenanreicherungen ohne Fraktionierungen bekannt ist (TANAKA u.a. 1963, WARNATZ 1968, FLAD u.a. 1970, NAVONE u. STRAMIGNONI 1974).

Betrachtet man die Immunoblasten als eine zusammengehörige Zellgruppe, so stellt man fest, dass in Fraktion I unter PHA und in Fraktion IV unter Endotoxin die höchsten Stimulationsraten auftreten. Aus dem bisher bekannten Zellverhalten unter

den Mitogenen PHA und Endotoxin lässt sich folgern, dass in Fraktion I vorwiegend T-Lymphocyten und in Fraktion IV B-Lymphocyten angereichert sind. Die T-Lymphocyten wären demnach in dem leichten Albumin, die B-Lymphocyten in dem schweren Albumin lokalisiert.

Mehrere Autoren haben versucht, mittels der Gradiententechnik Blut- oder Knochenmarkzellen zu trennen. Die ersten Ansätze dazu wurden von VALLEE (1947) und AGRANOFF u.a. (1954) geliefert. In neuerer Zeit befassten sich damit DICKE (1970), DICKE u.a. (1974), RIETHMÜLLER u.a. (1970), VOGT u.a. (1973), RICKARD u.a. (1974), WILLIAMS u.a. (1974), SHORTMAN (1968) und SHORTMAN u.a. (1972). Menschliches Blut wurde mittels eines diskontinuierlichen Gradienten von RIETHMÜLLER u.a. (1970), VOGT u.a. (1973) sowie RICKARD u.a. (1974), der menschliches Knochenmark benutzte, fraktioniert.

WILLIAMS u.a. (1974), der über einen kontinuierlichen Gradienten menschliches Blut auftrennte, findet Lymphocyten und Monocyten in den von uns ausgewiesenen Bereichen. Unter Zusatz von PHA in einer Agar-Kultur findet er Stimulation in dem Bereich von 20 und 24 % Albumin, ohne jedoch eine Fraktion mit maximaler Stimulation angeben zu können. B-Zellen ordnete er der leichten Albumin-Fraktion um 20 % zu. WILLIAMS stimulierte nicht mit Endotoxin.

Maximale Stimulation, gemessen mittels Isotopenmarkierungen, gibt RICKARD (1974) unter PHA-Zusatz in den Fraktionen mit 23 %, 25 %, 21 % und 27% Albumin an; angegeben in der Reihenfolge der Stimulationsgrösse.

VOGT u.a. (1973) erhält unter PHA-Einfluss Stimulationen in den Bereichen von 26 bis 32 % Albumin mit geringer Bevorzugung der 26 %-Fraktion. Diese Ergebnisse widersprechen den unseren. Als mögliche Erklärung hierfür muss angegeben werden, dass VOGT mit einem erheblich differierenden PH des Albumins

von 7,1 und anderen Dichtestufen arbeitet und mit 3000 g zentrifugiert. Zusätzlich wird ein Teil der Blutlymphocyten durch Nylonfasersäulen (DANIELS u.a. 1970) vorher abgefangen und geht nicht in die Kutlur ein.

Einzig RIETHMÜLLER u.a. (1970) stimulierte über einen diskontinuierlichen Gradienten gewonnene Lymphocyten mit PHA und dem spezifischen Stimulans Streptolysin O (HEINE 1973); dieses Stimulans stimuliert T- und B-Lymphocyten. Die maximale Stimulation unter PHA lag in dem Bereich von 20 bis 23 %igem Albumin, während sich in unseren Versuchen die maximale Stimulation mit PHA in dem Bereich von 19/21 % Albumin findet.

In den Versuchen von RIETHMÜLLER u.a. (1970) stimuliert Streptolysin O den gleichen Bereich wie PHA; allerdings sind für diese Versuche die erhaltenen Lymphocyten-Fraktionen bis 26 % Albumin und von 29 bis 33 % Albumin zusammengelegt worden, da sonst die Zellzahl für die Kulturversuche nicht ausgereicht hätte.

Bei den hier diskutierten Arbeiten bleibt festzuhalten, dass die Autoren mit unterschiedlichem PHA, osmotischem Druck und Zentrifugation arbeiteten. Ausserdem ist möglich, dass die Art des verwendeten Albumin sowie der Nährlösung einen Einfluss auf das Stimulationsverhalten der Zellen hat.

Eine Versuchsanordnung wie hier beschrieben, verbunden mit einer Stimulation von im Albumin-Gradienten angereicherten Lymphocyten durch die Mitogenen PHA und Endotoxin sowie morphologische Auswertung, ist in der Literatur nicht berichtet.

V. Zusammenfassung

Es wurde eine Methode der Auftrennung von venösem Blut gesunder Spender mittels diskontinuierlichem Gradienten in 4 Fraktionen beschrieben. Der Zellgehalt der einzelnen Fraktionen war ausreichend, um Kulturen mit PHA und Endotoxin von jeder Fraktion anzulegen und mit Stichproben nach 24, 48, 72, 144 Stunden auszuwerten.

Immunoblasten traten maximal zu 59,3 % nach PHA-Stimulation in der Dichte 19/21 %, nach Endotoxin-Stimulation maximal zu 75,8 % in der Dichte 25/27 % Albumin auf. Daraus wird geschlossen, dass die mit beiden Mitogenen stimulierbaren Lymphocyten eine unterschiedliche Dichte haben, wobei die mit PHA-stimulierbaren den T-Lymphocyten entsprechen, die mit Endotoxin-stimulierbaren den B-Lymphocyten.

VI. Tabellen zu den durchgeführten Versuchen

Vers. Nr.	Geschl.	Alter	Leukoc. pro µl	Stab.-u.Segm.-kernige in %	Lymphoc. in %	Monoc. in %	Erythroc. /µl x 10^6	Hb in g%	HbE in %
1	m	26	4300	63	31	3	5,3	15,5	29,0
2	m	26	8000	64	26	5	5,12	15,6	30,2
3	w	25	6000	49	44	3	4,09	13,5	32,8
4	m	26	4300	63	31	3	5,4	15,5	29,0
5	m	26	8000	64	26	5	5,12	15,6	30,2
6	w	25	5900	40	53	4	3,9	11,6	29,7
7	w	26	5900	58	38	3	3,31	10,8	32,5
8	w	22	5400	54	43	3	4,33	12,0	27,5

Tab. 1 enthält Angaben über das Geschlecht, Alter und Blutbild der Blutspender.

	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Fraktion I	0,32	3,52	59,34	-	-
Fraktion II	0,49	3,06	31,32	22,92	36,25
Fraktion III	0,19	6,01	12,63	28,46	-
Fraktion IV	0,06	6,02	25,49	47,45	-

Tab. 2 Immunoblastenverhalten unter PHA. Dargestellt werden die Mittelwerte der Immunoblasten aller 8 Versuche, pro Fraktion im Kulturverlauf unter Zusatz von PHA. Zahlenangaben in %.

	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Fraktion I	0,32	5,56	15,36	11,74	-
Fraktion II	0,49	10,37	32,36	50,85	6,0
Fraktion III	0,19	5,34	34,96	59,19	-
Fraktion IV	0,06	4,34	34,55	75,82	-

Tab. 3 Immunoblastenverhalten unter LPS. Dargestellt werden die Mittelwerte der Immunoblasten aller 8 Versuche, pro Fraktion im Kulturverlauf unter Zusatz von Endotoxin. Zahlenangaben in %.

	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Segmentkernige	4,02	-	-	-	-
Grosse Immunoblasten	-	0,17	8,09	-	-
Kleine Immunoblasten	0,32	3,36	51,30	-	-
Stimulierte Lymphocyten	3,18	26,17	7,32	-	-
Lymphocyten	69,79	69,96	32,06	-	-
Makrophagen	-	0,17	1,23	-	-
Monocyten	22,69	0,17	-	-	-

Tab. 4 zeigt das Verhalten aller kultivierter Zellen der Fraktion I unter PHA im Kulturverlauf. Zahlenangaben in %.

	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Segmentkernige	4,02	-	-	-	-
Grosse Immunoblasten	-	0,59	-	-	-
Kleine Immunoblasten	0,32	4,97	15,36	11,74	-
Stimulierte Lymphocyten	3,18	8,55	77,93	84,71	-
Lymphocyten	69,79	82,83	6,71	3,55	-
Makrophagen	-	1,0	-	-	-
Monocyten	22,69	2,05	-	-	-

Tab. 5 zeigt das Verhalten aller kultivierter Zellen der Fraktion I unter dem Einfluss von Endotoxin im Kulturverlauf. Zahlenangaben in %.

	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Segmentkernige	2,70	-	0,31	0,11	-
Grosse Immunoblasten	0,02	0,1	12,26	3,46	3,31
Kleine Immunoblasten	0,47	2,96	19,06	19,46	36,94
Stimulierte Lymphocyten	1,12	19,16	35,14	30,0	9,32
Lymphocyten	84,24	72,72	30,93	44,50	49,75
Makrophagen	-	0,2	0,68	2,2	0,34
Monocyten	11,45	4,86	1,59	0,27	0,34

Tab. 6 zeigt das Verhalten aller kultivierter Zellen der Fraktion II unter PHA im Kulturverlauf. Zahlenangaben in %.

	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Segmentkernige	2,70	0,05	0,04	-	-
Grosse Immunoblasten	0,02	1,74	2,83	3,51	-
Kleine Immunoblasten	0,47	8,63	29,53	47,34	6,0
Stimulierte Lymphocyten	1,12	31,42	49,11	43,06	12,0
Lymphocyten	84,24	53,24	16,50	5,83	82,0
Makrophagen	-	0,41	0,59	0,05	-
Monocyten	11,45	4,51	1,40	0,21	-

Tab. 7 zeigt das Verhalten aller kultivierter Zellen der Fraktion II unter dem Einfluss von Endotoxin im Kulturverlauf. Zahlenangaben in %.

	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Segmentkernige	0,44	0,12	-	0,14	-
Grosse Immunoblasten	0,06	0,12	0,49	1,47	-
Kleine Immunoblasten	0,13	5,89	12,14	26,99	-
Stimulierte Lymphocyten	2,07	23,05	55,77	57,44	-
Lymphocyten	90,13	70,06	30,44	13,45	-
Makrophagen	-	-	0,5	0,37	-
Monocyten	7,17	0,72	0,66	0,14	-

Tab. 8 zeigt das Verhalten aller kultivierter Zellen der Fraktion III unter PHA im Kulturverlauf. Zahlenangaben in %.

	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Segmentkernige	0,44	-	-	-	-
Grosse Immunoblasten	0,06	0,96	4,26	3,41	-
Kleine Immunoblasten	0,13	4,38	30,7	56,74	-
Stimulierte Lymphocyten	2,07	31,78	37,97	31,51	-
Lymphocyten	90,13	58,73	25,71	7,31	-
Makrophagen	-	0,12	0,63	0,13	-
Monocyten	7,17	4,03	0,39	8,16	-

Tab. 9 zeigt das Verhalten aller kultivierter Zellen der Fraktion III unter dem Einfluss von Endotoxin im Kulturverlauf. Zahlenangaben in %.

	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Segmentkernige	9,42	-	1,29	0,13	-
Grosse Immunoblasten	-	0,27	1,62	10,03	-
Kleine Immunoblasten	0,06	5,75	23,87	37,42	-
Stimulierte Lymphocyten	1,07	36,47	42,21	40,62	-
Lymphocyten	83,34	56,88	30,34	11,13	-
Makrophagen	-	0,1	0,17	0,33	-
Monocyten	6,29	0,63	0,3	0,1	-

Tab. 10 zeigt das Verhalten aller kultivierter Zellen der Fraktion IV unter PHA im Kulturverlauf. Zahlenangaben in %.

	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h
Segmentkernige	9,24	-	-	-	-
Grosse Immunoblasten	-	0,55	3,45	5,87	-
Kleine Immunoblasten	0,06	3,79	31,1	70,23	-
Stimulierte Lymphocyten	1,07	15,07	48,08	16,65	-
Lymphocyten	83,34	79,89	16,90	7,0	-
Makrophagen	-	0,05	0,53	0,07	-
Monocyten	6,29	3,65	0,94	0,23	-

Tab. 11 zeigt das Verhalten aller kultivierter Zellen der Fraktion IV unter dem Einfluss von Endotoxin im Kulturverlauf. Zahlenangaben in %.

VII. Abbildungen

VII.1 Graphische Abbildungen

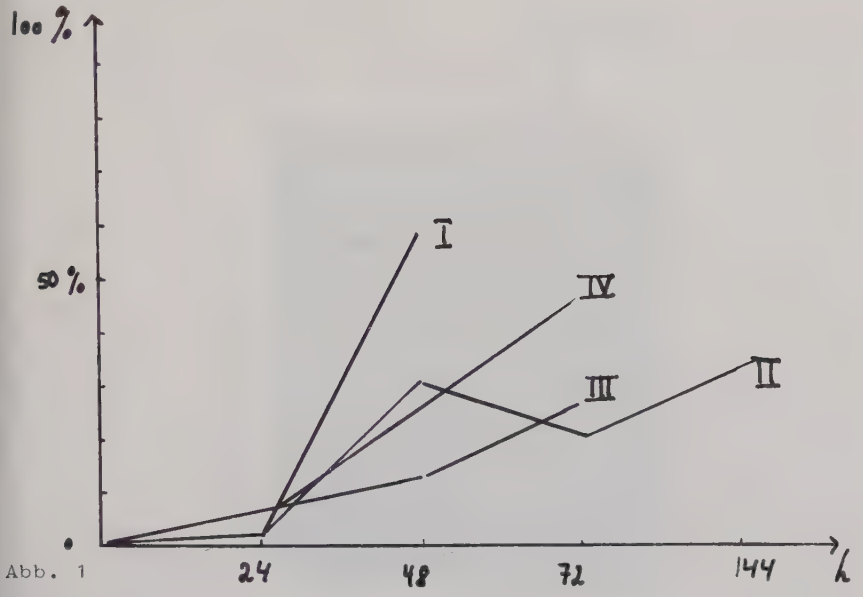

Abb. 1

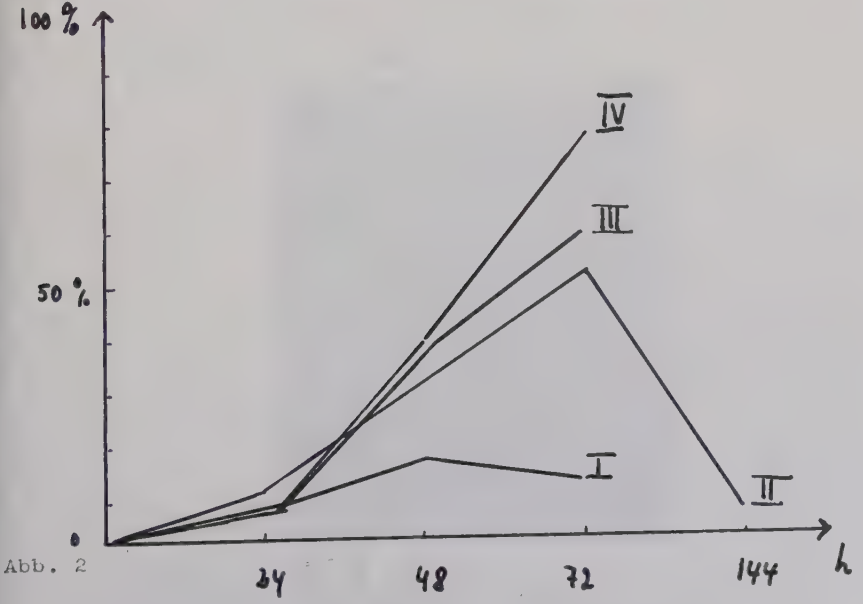

Abb. 2

Die Abbildung 1 zeigt das Verhalten der Immunoblasten während des Kulturverlaufs unter PHA.

Die Abbildung 2 zeigt das Verhalten der Immunoblasten während des Kulturverlaufs unter Endotoxin.

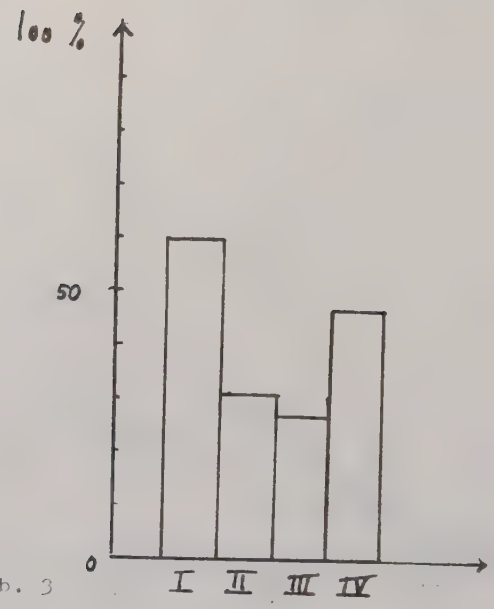

Abb. 3

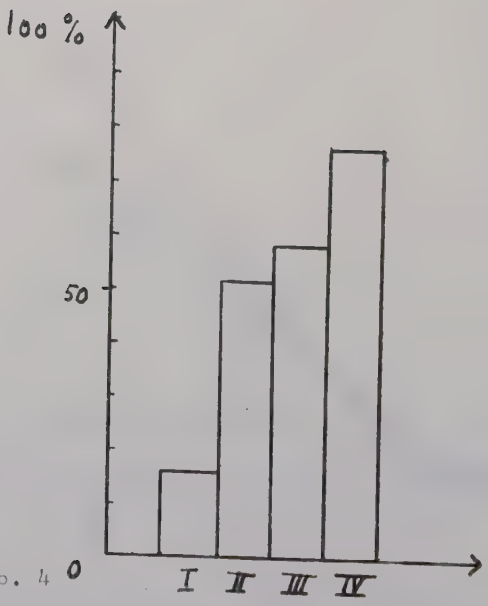

Abb. 4

Die Abbildung 3 zeigt die Maximalwerte der Immunoblasten unter PHA bis 72 h Kulturdauer.

Die Abbildung 4 zeigt die Maximalwerte der Immunoblasten unter Endotoxin bis 72 h Kulturdauer.

VII.2 Abbildungen von Immunoblasten, stimulierten Lymphocyten und Lymphocyten aus PHA-Kulturen der Fraktionen I - IV

Abb. 5 Fraktion I, 48 h. Die Abbildung zeigt zwei unterschiedlich grosse Immunoblasten, wovon der obere zu den Grossen Immunoblasten gerechnet werden muss. Der Nucleolus ist deutlich erkennbar. Vergrösserung 1350:1. PHA-Kultur.

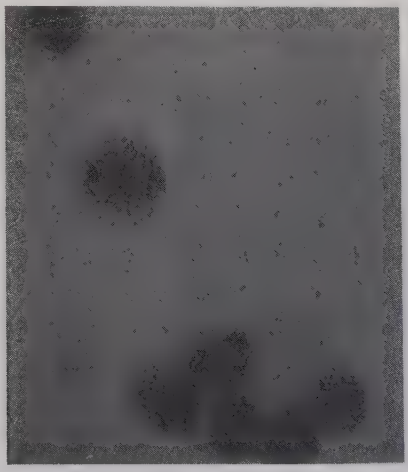

Abb. 6 Fraktion I, 48 h. In der Mitte des Bildes liegt ein Immunoblast; oben links ist ein stimulierter Lymphocyt und unten rechts 5 unterschiedlich grosse Immunoblasten zu sehen. Vergrösserung 1350:1. PHA-Kultur.

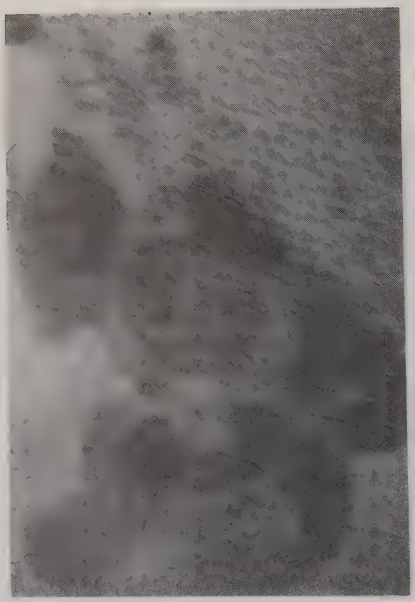

Abb. 7 Fraktion II, 72 h. Die Abbildung zeigt links oben einen normal grossen Blasten, schräg rechts daneben einen sehr grossen Immunoblasten mit deutlichem Nucleolus. Vergrösserung 1350:1. PHA-Kultur.

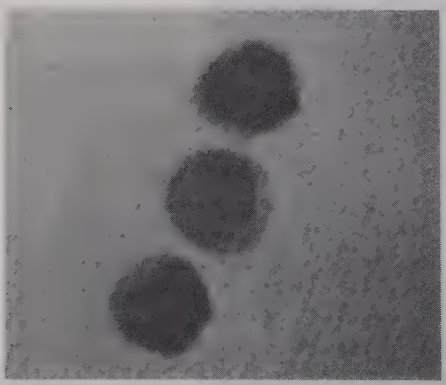

Abb. 8 Fraktion II, 144 h. Die Abbildung zeigt 3 Immunoblasten mit unterschiedlich stark ausgeprägten Nucleolen. Vergrösserung 1350:1. PHA-Kultur.

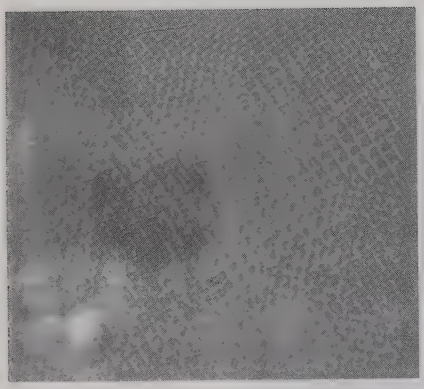

Abb. 9 Fraktion III, 72 h. Die Abbildung zeigt einen Immunoblasten. Vergrösserung 1350:1. PHA-Kultur.

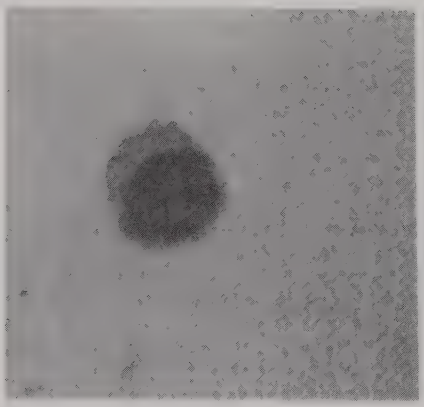

Abb. 10 Fraktion IV, 72 h. Die Abbildung zeigt einen Immunoblasten. Vergrösserung 1350:1. PHA-Kultur.

VII.3 Abbildungen von Immunoblasten, stimulierten Lymphocyten und Lymphocyten aus Endotoxin-Kulturen der Fraktionen I - IV

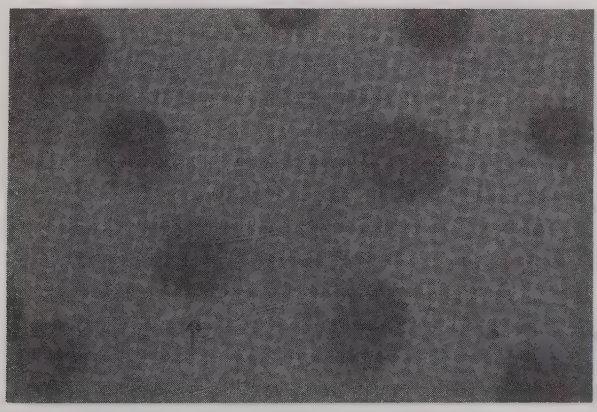

Abb. 11 Fraktion I, 72 h. Oben links ist ein geringfügig stimulierter Lymphocyt zu sehen, darunter zwei Blasten mit deutlich sichtbarem Nucleolus und bei dem Pfeil eine monocytäre Zelle. Die restlichen Zellen stellen stimulierte Lymphocyten dar. Vergrösserung 1350:1. Endotoxin-Kultur.

Abb. 12 Fraktion II, 72h. Die Abbildung zeigt 3 Immunoblasten mit unterschiedlich stark ausgeprägten Nucleolen. Vergrösserung 1350:1. Endotoxin-Kultur.

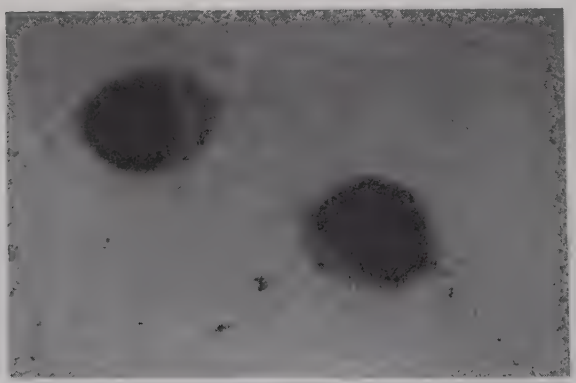

Abb. 13 Fraktion II, 144 h. Die Abbildung zeigt zwei Immunoblasten. Vergrösserung 1350:1. Endotoxin-Kultur.

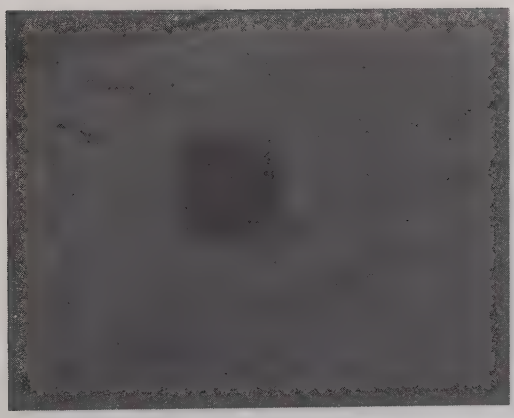

Abb. 14 Fraktion III, 72 h. Die Abbildung zeigt einen Immunoblasten. Vergrösserung 1350:1. Endotoxin-Kultur.

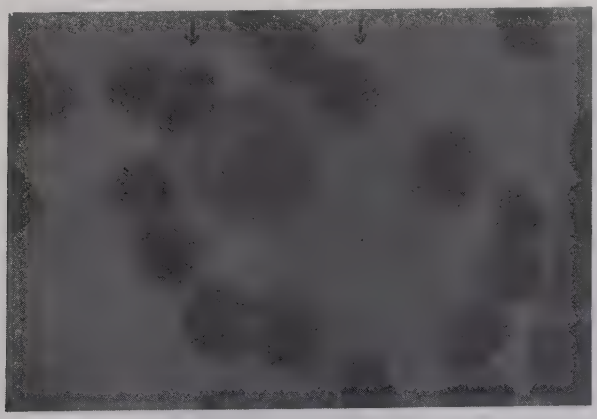

Abb. 15 Fraktion III, 72 h. Die Abbildung zeigt einen sehr grossen Immunoblasten mit vakuoligem Cytoplasma umgeben von kleineren Blasten und stimulierten Lymphocyten. Bei den Pfeilen sind monocytäre Zellen gezeigt. Vergrösserung 1350:1. Endotoxin-Kultur.

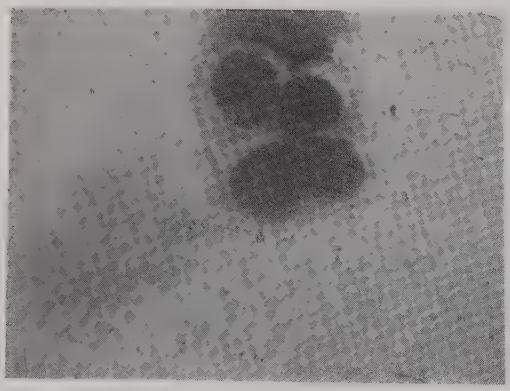

Abb. 16 Fraktion IV, 24 h. Dargestellt sind 4 Immunoblasten. Vergrösserung 1350:1. Endotoxin-Kultur.

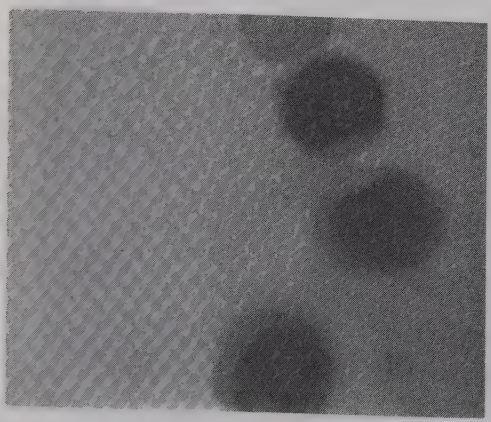

Abb. 17 Fraktion IV, 72 h. Dargestellt sind 3 Immunoblasten. Vergrösserung 1350:1. Endotoxin-Kultur.

VIII. Literaturverzeichnis

1. AGRANOFF, B.W.; VALLEE, B.L.; WAUGH, D.F.
Centrifugal subfractionation of polymorphonuclear leukocytes, lymphocytes and erythrocytes
Blood 9, 804, 1954

2. ANDERSSON, J.; MÖLLER, G.; SJÖBERG, O.
Selective Induction of DNA Synthesis in T and B Lymphocytes
Cellular Immunology 4, 381, 1972

3. AVERDUNK, R.
Über die Wirkung von Phytohämagglutinin und Antilymphozytenserum auf den Kalium-, Glucose- und Aminosäure-Transport bei menschlichen Lymphozyten
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 79, 1972

4. BEGEMANN, H.; HARWERTH, H.-G.
Praktische Hämatologie
Thieme Verlag, Stuttgart, 1974

5. BERMAN, L.
The Immunologically competent Cell ("Immunocyte") System-An Attempt at a Delineation of Cellular Relationship
Blood 21, 246, 1963

6. CHILLER, J.M.; SKIDMORE, B.J.; MORRISON, D.C.; WEIGLE, W.O.
Relationship of the Structure of Bacterial Lipopolysaccharides to Its Function in Mitogenesis and Adjuvanticity
Proc. Nat. Acad. Sci, USA, 70, 2129, 1973

7. CIRKOVIC, D.
Protection by Phytohemagglutinin of Human Blood Lymphocytes Irradiated in Vitro
Strahlentherapie 140, 318, 1970

8. COOPER, M.C.; LAWTON, A.R.
The Development of the Immune System
Scientific American, November, 59, 1974

9. COOPER, M.D.; PETERSON, R.D.A.; GOOD, A.
Delineation of the Thymic and Bursal Lymphoid Systems in the Chicken
Nature 205, 143, 1965

10. COOPER, M.D.; PETERSON, R.D.A.; SOUTH, M.A.; GOOD, A.
The Functions of the Thymus System and the Bursa System in the Chicken
J. Exp. Med. 123, 75, 1966

11. COULSEN, A.S.; COHN, R.
Lymphocyte Culture in Solid Medium
Immunology, 25, 307, 1973

12. CUTTS, J.H.
Cell Separation, Methodes in Hematology
Academic Press, London, 1970

13. DAMESHEK, W.
"Immunoblasts" and "Immunocytes" - An Attempt at a Functional Nomenclature
Blood 21, 243, 1963

14. DAMESHEK, W.
Chronic Lymphocytic Leukemia - an Accumulative Disease of Immunologically Incompetent Lymphocytes
Blood 29, 566, 1967

15. DANIELS, J.C.; SAKAI, H.; COBB, E.K.; REMMERS, A.R.; SARLES, H.E.; FISH, J.C.; LEVIN, W.C.; RITZMANN, S.E.
Altered Nucleic Acid Synthesis Patterns in Lymphocytes from Patient with Chronic Uremia
The American Journal of the Medical Sciences 259, 214, 197

16. DICKE, K.A.
Technical Manual of the Discontinuous Albumin Density Gradient Centrifugation Technic
Radio-biologic. Institut T.N.O.; Rijswijk, Nederlands, 1970

17. DICKE, K.A.; LÖWENBERG, B.; SCHAEFER, U.W.; VAN BEKKUM, D.W.
Allogene Knochenmarktransplantation nach Trennung durch Albumin-Dichtegradienten-Zentrifugation
20. Kongress d.Dtschen.Ges. f. Bluttransf. und Immunhaematologie, Berlin 1974

18. ELVES, M.E.; WILKINSON, J.F.
Effects of Phytohaemagglutinin on the Morphology of Cultured Leucocytes
Nature 194, 1257, 1962

19. FLAD, H.D.; HOCHAPFEL, G.; FLIEDNER, T.M. HEIMPEL, H.
Blastentransformation und DNS-Synthese in Lymphocytenkulturen von Patienten mit aplastischer Anaemie (Panmyelopathie)
Acta haemat. 44, 21, 1970

20. GALANOS, C.; RIETSCHEL, E.T.; LÜDERITZ, O.; WESTPHAL, O.
Interaction of Lipopolysaccharides and Lipid A with Complement
Eur. J. Biochem. 19, 143, 1971

21. GOOD, R.A.; BEGGAR, W.D.; PARK B.H.
Immunodeficiency diseases of man
in: Progress in Immunology (First internat. Congr. in Immunology, Washington D.C., ed. by B. AMOS)
Acad. Press, New York, 699, 1971

22. GOOD, R.A.; GABRIELSEN, A.E.; PETERSON, R.D.A.; FINSTAD, J.; COOPER, M.D.
The Development of the Central and Peripheral Lymphoid Tissue: Ontogenetic and Phylogenetic Considerations
Ciba Foundation on Thymus, 181, London, 1966

23. GREAVES, M.F.; ROITT, I.M.
The Effect of Phytohaemagglutinin and other Lymphocyte Mitogens on Immunoglobulin Synthesis by Human Peripheral Blood Lymphocytes in Vitro
Clin. exp. Immunol. 3, 393, 1968

24. HAVEMANN, K.; SCHMIDT, M.
Lymphocytenkulturen bei Hodgkinscher Erkrankung. Hinweis für zwei Lymphocytenpopulationen mit unterschiedlicher Reaktion auf Phytohämagglutinin (PHA)
Klin. Wschr. 1, 31, 1968

25. HEINE, K.M.
Funktion und Funktionsprüfung des lymphatischen Systems
Akademie-Verlag, Berlin, 1973

26. HUBER, H.; PASTNER, D.
Antigenreaktive Lymphozyten
Med. Klin. 64, 1183, 1969

27. HÜLSER, D.F.; PETERS, J.H.
Contact Cooperation in Stimulated Lymphocytes
Expti. Cell. Res. 74, 319, 1972

28. JANOSSY, G.
Activation of Human T and B Lymphocytes by Polyclonal Mitogens
Nature 248, 698, 1974

29. JANOSSY, G.; GREAVES, M.F.
Lymphocyte Activation. Discriminating Stimulation of Lymphocyte Subpopulations by Phytomitogens and Heterologous Antilymphocyte Sera
Clin. exp. Immunol. 10, 525, 1972

30. JANOSSY, G.; GREAVES, M.F.
Lymphocyte Activation. Response of T and B Lymphocytes to Phytomitogens
Clin. exp. Immunol. 9, 483, 1971

31. JANOSSY, G.; HUMPHREY, J.H.; PEPYS, M.B.; GREAVES, M.F.
Complement Independence of Stimulation of Mouse Splenic B Lymphocytes by Mitogens
Nature New Biology 245, 108, 1973

32. JERNE, N.K.
The Immune System
Scientific American, 229, 52, 1973

33. JIJI, R.M.; SACKS, M.S.; LINBERG, E.J.; SHURLING, C.L.
Failure of Thymektomie to Alter the Subsequent Course of Human Acute Leucemia in Drug-Induced Remission
Blood, 26, 142, 1965

34. LEGGE, D.G.; SHORTMAN, K.
The Effect of pH on the Volume, Density and Shape of Erythrocytes and Thymic Lymphocytes
Brit. J. Haemat. 14, 323, 1968

35. LEIF, R.C.
Density Gradient System - I. Formation and Fractionation of Density Gradients
Anal. Biochem. 25, 271, 1968

36. LEIF, R.C.
Density Gradient System - II. A 50-channel programmable undulating diophragm peristaltic pump
Anal. Biochem, 25, 283, 1968

37. LEIF, R.C.; VINOGRAD, J.
The Distribution of Buoyant Density of Human Erythrocytes in Bovine Albumin Solutions
Proc. N.A.S. 51, 520, 1964

39. LENNERT, K.
Bildung und Differenzierung der Blutzellen, insbesondere der Lymphocyten
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 50. Tagung, 163, 1966

40. LI, J.G.; OSGOOD, E.E.
A method for the rapid separation of leukocytes and nucleated erythrocytes from blood or marrow with a phytohemagglutinin from red bean
Blood 4, 670, 1949

41. LOEB, L.A.; EWALD, L.; AGARWAL, S.S.
DNA-polymerase and DNA replication during lymphocyte transformation
CANCER Res. 30, 2514, 1970

42. METCALF, D.; WARNER, N.L.; NOSSAL, G.J.V.; MILLER, J.F.A.P.; SHORTMAN, K.
Growth of B Lymphocyte colonies in vitro from mouse lymphoid organs
Nature 255, 630, 1975

43. MUNIZ, F.J.; HOUSTON, E.W.; CRUZ-ABAD, L.; RITZMANN, S.E.; LEVIN, W.C.
Nuclear Volume Distribution of Phytohaemagglutinin-Stimulated Human Lymphocytes
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 135, 334, 1970

44. NAVONE, R.; STRAMIGNONI, A.
PHA Response of Blood and Lymph Node Lymphocytes in vitro in Malignant Lymphomas
Acta haem t. 51, 76, 1974

45. NOWELL, P.C.
Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes
Cancer Res. 20, 462, 1960

45. OWEN, J.J.T.
The Origins and Development of Lymphocyte populations
A Ciba Foundation Symposium, 35, London, 1972

46. PAPPAS, A.
Die Lymphocytenkultur
Annales Universitatis Saraviensis, Medizin, 1975

47. PAPPAS, A.; SCHEURLEN, P.G.
Transformation von Lymphocyten unter Phytohämagglutinin bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen
Verh. deutsch. Ges. imm. Med. 73, 472, 1967

48. PAULI, R.M.; STRAUSS, B.S.
Proliferation of Human Peripheral Lymphocytes
Exptl. Cell Res. 82, 357, 1973

49. PEAVY, D.L.; ADLER, W.H.; SMITH, R.T.
The Mitogenic Effects of Endotoxin and Staphylococcal Enterotoxin B on Mouse Spleen Cells and Human Peripheral Lymphocytes
The Journal of Immunology, 105, 1453, 1970

50. PEAVY, D.L.; SHANDS, J.W.; ADLER, W.H.; SMITH, R.T.
Mitogenicity of Bacterial Endotoxins: Charakterization of the Mitogenic Principle
The Journal of Immunology, 111, 352, 1973

51. PEREIRA, G.
Identification of Two Populations of Lymphocytes In Rats and Mice By Routine Electron Microskopy
Am. J. Anat. 140, 601, 1974

52. PHILLIPS, B.; ROITT, J.M.
Evidence for Transformation of Human B Lymphocytes by PHA
Nature New Biology 241, 254, 1973

53. POLLIAK, A.V.; LAMPEN, N.; CLARKSON, B.; De HARVEN, E.
Identification of human B and T Lymphocytes by Scanning elektron mikroskopy
J. Exp. Med. 138, 607, 1973

54. RAFF, M.C.
T and Lymphocytes and Immune Responses
Nature 242, 19, 1973

55. RAFTER, G.W.
Leucocytic Pyrogen generated by Endotoxin
Nature 222, 490, 1969

56. RAZAVI, L.
Cytoplasmic Localization of Phytohaemagglutinin in Peripheral White Cells
Nature 210, 444, 1966

57. RICKARD, K.A.; DUNLEAVY, L.; BROWN, R.; KRONENBERG, H.
Fractionation Of Normal Human Bone Marrow On Albumin Gradients
AJEBAK 52, 767, 1974

58. RIGAS, A.; OSGOOD, E.E.
Purification and Properties of the Phytohemagglutinin of Phaseolus Vulgaris
J. Biol. Chem. 212, 607, 1955

59. RIETHMÜLLER, G.; RIEBER, E.P.; RIETHMÜLLER, D.
Untersuchungen zur Heterogenität humaner Lymphocyten: Trennung peripherer Lymphocyten im Albumindichtegradienten und Untersuchung der einzelnen Zellpopulationen auf ihre proliferative Reaktion in vitro
Klin. Wschr. 22, 1343, 1970

60. SAULI, S.; ASTALDI, G.
Die Proliferation der Leucocyten des normalen menschlichen Blutes in Gegenwart des Phytohämagglutinins
Schweizerische medizinische Wochenschrift 41, 1475, 1963

61. SHORTMAN, K.
The Separation of Different All Classes from Lymphoid organs
Aust.J. exp. Biol.Med. Sci. 46, 375, 1968

62. SHORTMAN, K.
Equilibrium Density Gradient Separation and Analysis of Lymphocyte Population
in: GERRITSEN, T., Progress in Separation and Purification 2, 167, 1969

63. SHORTMAN, K.
Physical Procedures For The Separation Of Animal Cells
Annual Review of Biophysics and Bioengineering 1, 93, 1972

64. SHORTMAN, K.; CEROTTINI, J.C.; BRUNNER, K.T.
The Separation of Subpopulations of T and B Lymphocytes
Eur.J. Immunol. 2, 313, 1972

65. SHORTMAN, K.; SELIGMAN, K.
The Separation of Different Cell Classes from Lymphoid Organs. III. The Purification of Erythroid Cells by pH-induced Density changes
J. Cell. Biol. 42, 783, 1969

66. STOBBE, H.; HEINE, K.M.
Untersuchungen zur Patnogenese lymphoproliferativer Erkrankungen
Schweiz. med. Wschr. 99, 631, 1969

67. STUTMAN, O.; YUNIS, E.J.; GOOD, R.A.
Carcinogen-Induced Tumors of the Thymus
Journ. Exp. Med. 130, 809, 1969

68. TANAKA, Y.; EPSTEIN, L.B.; BRECHER, G.; STOHLMAN, F.
Transformation of Lymphocytes in Cultures of Human Peripheral Blood
Blood 5, 614, 1963

69. TÄRNVIK, A.
Red Cells, Erythroagglutinating Activity of Phytohaemagglutinin and Lymphocyte Stimulation
Acta path. microbiol. scand. Section B 79, 635, 1971

70. VALLEE, B.L.; HUGHES, W.L.; GIBSON, J.G.
A Method For The Separation Of Leucocytes From Whole Blood By Flotation On Serum Albumin
Blood, Special Issue 1, 82, 1947

71. VOGT, W.; SCHOLLE, H.; SCHLAG, W.; BOCHERT, G.; RÜHL, H.
Lymphozytenstimulation bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie: Trennung peripherer Lymphozyten über einen diskontinuierlichen Albumin-Dichtegradienten
Blut 28, 43, 1973

72. WARNATZ, H.
Das Phänomen der Lymphozytentransformation in der Pathogenese und Diagnostik von Autoimmunerkrankungen
Z. ges. exp. Med. 149, 64, 1968

73. WATSON, J.; TRENKER, E.; COHN, M.
The Use of Bacterial Lipopolysaccharides to show that Two Signals are Required for the Induction of Antibody Synthesis
Journ. Exp. Med. 138, 699, 1973

74. WENDT, F.
Über die Pathogenese des Fiebers
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 69. Kongress, 327, 1962

75. WHEATLEY, D.N.
Cell Growth and Division in Hypertonic Medium
Exptl. Cell Res. 87, 219, 1974

76. WILLIAMS, N.; MOORE, M.A.S.; SHORTMAN, K.; CONDON, L.; PIKE, B.; NOSSAL, G.J.V.
Density Separation and Characterisation of Human Blood Leucocytes, Including T and B-Lymphocytes
AJEBAK 52, 491, 1974

77. WINKELSTEIN, A.; CRADDOCK, C. G.
Comparative Response of Normal Human Thymus and Lymph Node Cells to Phytohemagglutinin in Culture
Blood 29, 594, 1967

78. YAMAMOTO, H.
Reversible Transformation of Lymphocytes in Human Leucocytes Cultures
Nature 212, 997, 1966

Lebenslauf

Ich wurde als Sohn des Arztes Dr. Alfred Biermann und seiner Ehefrau Ingeborg am 11.6.1945 in Melle geboren.
Nach der Schulzeit am Leibniz-Gymnasium in Duisburg-Hamborn besuchte ich die Freie Universität Berlin; hier legte ich 1973 die ärztliche Prüfung ab. Die Approbation wurde mir 1974 erteilt.
Im Hamburger B.-Nocht-Institut legte ich 1974 das tropenmedizinische Examen ab. Seit Ende 1974 bin ich wissenschaftlicher Assistent am Anatomischen Institut der FUB, Abteilung für Haematologie und Elektronenmikroskopie.

Druck: Schnelldruck Steglitz, 1 Berlin 41,
Berlinickestraße 14-15, Tel.: 791 80 80